

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : - 60-111159

(43)Date of publication of application : 17.06.1985

(51)Int.Cl.

G01N 33/569

A61K 39/385

(21)Application number : 58-217808

(71)Applicant : TOMIYAMA TETSUO
SEINAN SOGO KAIHATSU KK

(22)Date of filing : 21.11.1983

(72)Inventor : TOMIYAMA TETSUO

(54) LATEX SENSITIZED WITH TUBERCLE BACILLUS PHOSPHOLIPID AND DETECTION OF TUBERCLE BACILLUS PHOSPHOLIPID ANTIBODY USING SAID LATEX**(57)Abstract:**

PURPOSE: To detect easily tubercle bacillus phospholipid with high sensitivity and to perform exactly diagnosis, etc. of the patient carrying the tubercle bacilli by observing the agglutination image formed when the latex contg. the sensitized latex particles carrying the tubercle bacillus phospholipid on the surface is brought into reaction with a bodily fluid.

CONSTITUTION: The tubercle bacillus phospholipid obtd. by drawing the bacilli from the medium culturing the tubercle bacilli and killing the same by heating is deposited on (co)polymer latex particles of styrene, metaly methacrylate, etc. The better result is obtd. if said phospholipid is deposited on high specific gravity latex particles having 0.9W1.4 specific gravity. Glycine and dextran are preferably added respectively at 0.2W 2wt% and 0.3W3wt% as a stabilizer to the resulting latex carrying the tubercle bacilli. Such sensitized latex is brought into conact with the human bodily fluid or the dilute liquid thereof by a microtiter method and the agglutination image thereof is observed. The decision on the results of the diagnosis and treatment of the active tuberclar patient is thus made possible irrespectively of tubercclin positive or negative with high sensitivity by determining quantitatiely the tubercle bacillus phospholipid without the need for a pretreatment for the sample serum.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭60-111159

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)6月17日

G 01 N 33/569

7906-2G

A 61 K 39/385

7043-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑮ 発明の名称 結核菌リン脂質感作ラテックス及びそれを用いた結核菌リン脂質抗体の検出方法

⑯ 特 願 昭58-217808

⑰ 出 願 昭58(1983)11月21日

⑱ 発 明 者 富 山 哲 雄 東京都練馬区大泉学園町7-2-2

⑲ 出 願 人 富 山 哲 雄 東京都練馬区大泉学園町7-2-2

⑳ 出 願 人 西南総合開発株式会社 大阪市北区西天満6丁目7番2号

㉑ 代 理 人 弁理士 津 国 肇

明 細 書

1. 発明の名称

結核菌リン脂質感作ラテックス及びそれを用いた結核菌リン脂質抗体の検出方法

2. 特許請求の範囲

(1) 表面に結核菌リン脂質を担持したラテックス粒子を含有する結核菌リン脂質感作ラテックス。

(2) ラテックス粒子の比重が0.9~1.4である特許請求の範囲第1項記載の感作ラテックス。

(3) 表面に結核菌リン脂質を担持したラテックス粒子を含有するラテックスにさらに安定剤を加えた特許請求の範囲第1項記載の感作ラテックス。

(4) 安定剤がグリシン及びデキストランである特許請求の範囲第3項記載の感作ラテックス。

(5) 希釈液に対するグリシン及びデキストランの濃度が、それぞれ0.2~2重量%及び0.3~3重量%である特許請求の範囲第4項記載の感作ラテックス。

(6) 表面に結核菌リン脂質を担持したラテックス粒子を含有する結核菌リン脂質感作ラテックス

をヒトの体液もしくはその希釈液と接触させ、凝集像を観察することを特徴とする結核菌リン脂質抗体の検出方法。

(7) ラテックス粒子が高比重ラテックス粒子である特許請求の範囲第6項記載の検出方法。

(8) 凝集反応をマイクロタイター法によって行なうことを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の検出方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は結核菌リン脂質感作ラテックス及びそれを用いた結核菌リン脂質抗体の検出方法に関し、更に詳しくは、結核菌リン脂質抗体を簡易かつ高精度に測定可能な結核菌リン脂質感作ラテックス及びそれを用いた結核菌リン脂質抗体の検出方法に関する。

結核、特に肺結核は非常に頻度の高い呼吸器疾患であり(日本における年間患者数:約10万人)結核菌の感染によって惹起されることは既に周知の通りである。現在、この結核の診断法として、結核菌の分離培養、胸部レントゲン所見、ツベル

クリン反応などが用いられている。この内、結核菌の分離培養は最も確実な診断法であるが、結核菌は発育が緩慢な為、分離培養には8~12週間を要し、しかも、分離培養できるのは排菌者だけに限られ、大部分の患者である非排菌者は培養陰性と判断される。すなわち、たとえ排菌者でも早期の診断は不可能である。その点ではツベルクリン反応は短時間で結果が得られるが、この反応は結核菌の感染の過去における既往を示すだけであり、既往があれば、健康者でも、結核以外の呼吸器感染症でも、ほとんど、すべての人が陽性を示すので、現疾患の診断には参考程度にしかならない。そこで、最も高く評価されているのは胸部レントゲン所見であるが、結核のみに特有の肺陰影所見というものは存在せず、肺真菌症、肺癌、肺炎、肺吸虫症などとレントゲン所見のみで確実に鑑別することは多くの場合不可能であることも周知の通りである。しかし、肺真菌症、肺吸虫症、肺癌などと結核では治療薬も治療方針も全く異なるので、早期における確実な診断は是非とも必要である。

この為に、古くから結核の血清学的診断法が数多く研究されてきた。その代表的なものとして、1948年にアメリカ合衆国で発表されたミドルブルック・デュボス反応(Middlebrook Dubos Test; G. Middlebrook 及び R. Dubos、Journal of Experimental Medicine、88巻、521頁、1948年)と1955年にオランダで発表されたボイデン反応(Boyden Reaction、Journal of Experimental Medicine、93巻、107頁、1951年)がある。前者は結核菌菌体の多糖体を赤血球に感作したもの、後者は培養濾液中のツベルクリン蛋白質を赤血球に感作したものをを用い、受身血球凝集反応によって患者血清中の抗体を測定し、診断しようとしたものである。しかし、これらの反応は、文献(L.R.Cole、J.T.Matloff及び R.Parrell: Journal of Experimental Medicine、102巻、647頁、1955年; 伊藤忠雄他、慶応医学、30巻、291頁、1953年)にもみられる如く、結核の発病とは無関係に結核菌の感染によってほとんどすべてが陽性を示し、ツベルクリン反応と同様に感染の既

往の有無を示すだけで、現疾患の診断にはほとんど無効であることが判明するに及んでほとんど応用されなくなった。これに対し、結核菌リン脂質に対する抗体は、単なる結核菌の感染だけでは産生されず、病理学的、臨床的経過の軽重によく並行して産生されることが確認された。このことは、文献(小野寺忠雄: 結核の研究、12巻、23頁、1960年; 高橋義夫: 日本細菌学会誌、15巻、935頁、1960年; Y.Takahashi 及び T.Onodera: Compt.rend.Soc.Biol. 154巻、887頁、1960年; Y.Takahashi 他: Compt.rend. Soc. Biol. 154巻、1132頁、1960年)に記載されている。また、このことは、例えば高橋義夫(結核、36巻、409~420頁、1961年)によると、結核患者201人及びツベルクリン反応陽性の健康者100人についてみると、多糖体を用いた反応では患者、健康者の別なく100%陽性、蛋白を用いた反応では患者55%、健康者45%陽性に対し、リン脂質を用いた反応では患者80%、健康者5%が陽性であった。また、

活動性及非活動性の結核についてみると、多糖体と蛋白抗原による反応は相関を示さなかったが、リン脂質抗原を用いる反応では活動性の度合と抗体価がよく相関したと報告している。以上のように結核菌リン脂質を抗原に用いて、リン脂質抗体を測定するならば、結核の診断は非常に正確に、しかも活動性の程度をよく判断できることが知られている。このリン脂質による血清反応としては主に受身血球凝集反応(Y.Takahashi 及び K.Ono: Amer.Rev.Resp.Dis.、83巻、381頁、1961年)とカオリン凝集反応(Y.Takahashi: Amer.Rev. Resp. Dis.、85巻、708頁、1962年)が行われてきた。しかし、前者は羊生赤血球を用いる方法であるために保存性が全くなく、その都度感作血球を調製しなければならないので多くの労力を要し、しかも安定な結果を得にくい欠点があった。また、人の血清中には羊血球に対する非特異的凝集素が含まれている為に、予め吸収処理をしなければならず、しかも、その為の対照試験を要する。これに対し、カオリン凝集反応は担体に対する抗体が

存在しない点で有利であるが、この試薬も反応のたびに調製しなければならず、反応もやや煩雑で、しかも判定は反応試験管を遠心して、1本ずつ振盪による凝集像をみなければならず、容易に実施できる反応とは言い難いという欠点があった。

本発明の目的は、上記した欠点の解消にあり、すなわち、結核菌リン脂質抗体を簡易かつ高精度に測定可能な結核菌リン脂質感作ラテックス及びそれを用いた結核菌リン脂質抗体の検出方法の提供にある。

本発明者は、これら従来法の難点を解決し、結核菌リン脂質抗体を容易かつ特異的に比較的短時間で測定し、結核を高い精度で早期に診断する方法を開発すべく鋭意研究を重ねた結果、結核菌リン脂質を保存性の高いラテックス粒子に感作して結核菌リン脂質感作ラテックスを製造し、これを用いて試料を何ら前処理することなく体液中の結核菌リン脂質抗体を受身ラテックス凝集反応（以下、「PLA」と略す。）により非常に簡便容易に測定することに成功し、本発明を完成するに至

った。

すなわち、本発明は、表面に結核菌リン脂質を担持したラテックス粒子を含有する結核菌リン脂質感作ラテックス；及び該感作ラテックスをヒトの体液もしくはその希釈液と接触させ、凝集像を観察することを特徴とする結核菌リン脂質抗体の検出方法に関するものである。

本発明の感作ラテックスを製造するために用いるラテックスとしては、例えば、スチレン、ビニルトルエン、クロロスチレン、メタクリル酸メチル、塩化ビニル、塩化ビニリデンなどの均一重合体もしくは共重合体；カルボキシル化ポリスチレン、アミノ基を有するカルボキシル化ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、カルボキシル化スチレン-ブタジエン共重合体、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、ビニルトルエン-第三ブチルスチレン共重合体、ポリエステル、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリアクリロニトリル、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレート、ポリ

ビニルピロリドン、塩化ビニル-アクリレート共重合体などの合成高分子ラテックス粒子からなるラテックスが挙げられ、さらにこれらの合成高分子ラテックス粒子の表面を非イオン界面活性剤等で処理したものを用いてもよい。上記した合成高分子ラテックスのなかでもポリスチレンラテックスが好ましい。ラテックス粒子の粒径は、0.01～10 μ であり、好ましくは0.5～1.0 μ であるが、分析試験結果の再現性を良くするためには、粒径分布の幅が狭いもの、例えば $\pm 5\%$ 以下のものが望ましい。また、使用されるラテックス粒子の比重は0.9～1.4であることが好ましい。

また、これらの重合体のうち、本発明の検出方法において使用される感作ラテックスのラテックスとしては、例えばスチレン、ビニルトルエン、クロロスチレン、メタクリル酸メチル、塩化ビニル、塩化ビニリデン等の均一重合体もしくは共重合体ラテックスなどが有利に用いられ、これらのラテックスのなかでもクロロスチレン、メタクリル酸メチル、塩化ビニリデンの均一重合体あるいは

はこれらと他のモノマー（例えばスチレン）との共重合体などが好都合に用いられる。これらのラテックス粒子は従来通常の血清学的凝集反応担体として使用されているポリスチレン粒子（比重1.05）より高比重であり、とりわけ比重1.1～1.4程度のものを使用するのが好ましく、比重1.15以上のものを使用するのが更に好ましい。

これ等のラテックス粒子としては、一般に平均粒径0.1～1 μ 程度のものを用いることが出来るが、とりわけ0.3～1.6 μ 程度の粒子径を持つものを用いるとマイクロプレートのウェル内で約10時間以内で完全に沈降し実施上好都合である。

上記したラテックス粒子としては、特開昭51-9716号公報記載の方法に従ってエチレンオキシド系非イオン界面活性剤を吸着させたものを用いるのが好ましい。このエチレンオキシド系非イオン界面活性剤としては、エチレンオキシドとポリオキシプロピレングリコールのブロックポリマー、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテルなど

が好都合に用いられる(特開昭51-9716号公報参照)。

本発明に用いる結核菌リン脂質は、公知のリン脂質の調製法により得ることができる。この方法の具体例としては、L.Nägreが1950年に提案した方法が挙げられるが、この方法により得られたリン脂質は粗製であるため、副反応を起こす可能性があり、精製したものをを用いることが望ましい。この精製法としては、例えば、高橋の方法(Y. Takahashi, Amer. Rev. Resp. Dis., 85巻、708頁、1962年)、Anderson法(山村雄一、結核菌の生化学、共立出版、1965年)、Lederer法(同前)等が挙げられる。

本発明の感作ラテックスを製造するには、まず、結核菌の培養による菌体を調製する必要があるが、これに用いる菌株、培地は多量の菌体を得やすければ通常用いられるどのようなものでもよく、菌株や培地に限定されるものではない。培養菌体は加熱又はアセトンによって死菌とした後、アセトン抽出を繰り返し、このアセトン抽出後の菌体か

ら37~45℃のメタノールで抽出した抽出液をとる。これを蒸発乾燥した後、熱アセトンで処理して不溶性の残渣を分取し、クロロホルムに溶解した後、アセトンを加えて生じた沈澱を分取する。これをメタノールに溶解し、4℃に保存する。

次に、抗原である結核菌リン脂質をラテックス粒子に感作させる為には、該ラテックス粒子と抗原とを水、生理食塩水、pH 5.5~10、好ましくはpH 6.4~7.6の各種緩衝液等の中で、濃度0.05~3%のラテックス粒子と抗原とを約4~40℃において30分~24時間ゆるやかに攪拌しながら接触させることによって行なう。緩衝液としては、例えばリン酸塩緩衝食塩水、グリシン緩衝食塩水などである。感作終了後は水性溶媒、例えばこれから緩衝液で洗浄することにより、ラテックス粒子に吸着されない抗原を完全に除去する。さらに、このラテックスは蛋白質をふくむ希釈液に懸濁させてラテックス粒子の抗原未感作部分を蛋白質で飽和しておくといふ。

希釈液としては、例えばグリシン緩衝食塩水、

リン酸塩緩衝食塩水等に牛血清アルブミン(以下「BSA」と略す)約0.1%などを加えたものを用い、0.01~0.5%のナトリウムアジド(NaN_3)を加えておく。

このようにして得られた感作ラテックスは0.25重量%程度に希釈液に懸濁させた状態で氷室に保存してもよいし、凍結乾燥しておいてもよい。凍結乾燥する為には希釈液に安定剤として各種アミノ酸類、特にグリシン又はグルタミン酸ナトリウム及びデキストランを、それぞれ0.2~2重量%及び0.3~3重量%加えた培地に2.5%程度に懸濁してから液体窒素あるいは液体空気中などで急速凍結してから凍結乾燥する。凍結乾燥により保存期間はさらに延長され、通常2年以上安定である。しかも、凍結乾燥品は、使用の際、単に希釈液を加えるのみで新鮮調製品と同様の品質的に安定した感作ラテックスが得られる。

本発明の結核菌リン脂質感作ラテックスは結核菌リン脂質抗体により凝集されるので、人の体液もしくはその希釈液と結核菌リン脂質感作ラテ

ックスとを接触させると、体液中又はその希釈液中に結核菌リン脂質抗体が存在する場合には、この抗体によって感作ラテックスが凝集する。この反応をマイクロタイター法で行なう場合、マイクロプレート上に管底凝集像として認めることができる。すなわち、プレートに一定量の希釈液を滴下分注し、次いで第1穴目に一定量の体液を加え、ダイリユーターで順次希釈する。これに結核菌リン脂質感作ラテックスを滴下分注し、一定時間後に管底凝集像を判定する。

本発明の感作ラテックスは次の点で極めて大きな利点を有している。すなわち、体液中にはラテックスそのものに対する非特異的凝集素、すなわち担体に対する抗体が全く存在しえず、また実際に発見されていないので被検体液を何等前処理する必要がなく、またその為の確認試験も必要としない。マイクロプレートのウェルに体液もしくはその希釈液を入れ、これに感作ラテックスを滴下するだけでよい。すなわち結核菌リン脂質抗体の定量は極めて容易かつ簡便であり、特別の技術を

要しない。しかも抗原が精製されているので特異的であり、しかも感度は人体液中の測定に充分であり、同時に多数の検体の定性及び又は定量を行なうことができる。

本発明の感作ラテックスを用いれば、従来、反応のたびに試薬を調製し、しかも複雑なカオリン凝集反応等に頼っていた体液中の結核菌リン脂質抗体濃度を極めて容易かつ簡便に定量することができ、結核を正確かつ早期に診断できるようにしたことの他に治療効果の正確な判定、予後の予測を行なうこともできる。

結核菌リン脂質ラテックス凝集反応に関しては、現在までに、「結核菌リン脂質をラテックスに感作することは不可能であった」とする文献(T.M. Dietz, et al, Amer. Rev. Resp. Dis., 95巻、638～642頁、1967年)が1例あるのみで、結核菌リン脂質をラテックスに感作できたとする文献は全くなく、感作ラテックスを用いる凝集反応は全く新規である。

また、本発明の感作ラテックスは結核菌免疫血

清又は結核患者血清にのみ反応し、この血清に抗原を加えて中和した後は、この感作ラテックスは全く反応しないこと、未感作ラテックスは上記の陽性反応を示す血清に全く反応しないことから、この感作ラテックスは結核菌リン脂質が結合しているものであるといえる。

以上、詳述したように、本発明によれば、結核菌リン脂質抗体を簡易かつ高精度に測定可能であり、その実用的価値は極めて大である。

次に本発明を調製例及び実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限りこれらによって限定されるものではない。

調製例1.

結核菌リン脂質の調製

結核菌(Mycobacterium tuberculosis) H37 Rv株をソートン培地で37℃で8週間培養し、得られた菌体を100℃で60分加熱して死菌とした。これを約10容のアセトンで4回抽出を繰り返し、抽出後の菌体に5容のメタノールを加え、45℃で5時間ずつ3回抽出した。抽出液を合わせて、

これを減圧で乾固し、5容のアセトンを加え、80℃の水浴中で1時間処理した後、残渣を集め5容のクロロホルムに溶解した。これにアセトンを加えて、生じた沈渣を集め、減圧で乾固した後、メタノールに溶解した。55gの菌体から1.35gのリン脂質を得た。

実施例1

結核菌リン脂質感作ラテックスの調製

1/15Mリン酸塩緩衝液(pH 7.2) 1容と生理食塩水3容との混合液(以下「PBS」と略す)にラテックス(武田薬品工業(株)製、SDL59(比重1.18、粒径0.9μ))をその粒子濃度が0.25%になるように懸濁し、これに、メタノールに溶解した結核菌リン脂質0.2mg/mlを等量加え、ゆっくり攪拌しながら室温に3時間保った。3000rpmで10分遠心分離して感作ラテックス粒子を分取し、PBS、次いで希釈液で洗浄した後、希釈液に0.25%になるように懸濁して結核菌リン脂質感作ラテックスを得た。この感作ラテックスは、結核菌免疫ウサギ血清に凝集反応を示したが、この

血清に精製結核菌リン脂質を加えた後に感作ラテックスを加えた場合は全く凝集がおこらなかった。また結核菌リン脂質を感作しないラテックスは同一の条件で上記の免疫血清を加えても凝集しなかった。すなわち、この感作ラテックスは結核菌リン脂質抗体に特異的に反応して凝集することが確認できた。

希釈液は1/60M、pH7.2のリン酸塩緩衝食塩水にBSAを0.1%になるように加えたものである。

結核菌リン脂質感作ラテックスの凍結乾燥

上述のようにして調製した感作ラテックスを、グリシン0.5重量%、デキストランT-10 0.7重量%含有した希釈液に2.5%となるように希薄させ、液体窒素中に浸漬して急速凍結させてから凍結乾燥した。

実施例2

結核菌リン脂質抗体価の測定

V型マイクロプレート各穴に希釈液を0.025mlずつ分注し、第1穴目に希釈液で1:100に

希釈した血清を0.025ml 加えた。ダイリユーターで順次倍數希釈した。これに実施例1で得られた結核菌リン脂質感作ラテックスを0.025ml ずつ分注し、マイクロミキサーでよく混和した後、室温に10時間以上静置し、凝集の終末点を測定し、陽性を示す血清の最大希釈倍數の逆數をとって抗体価とした。この方法を用いて、結核菌培養等により診断の確定している活動性肺結核患者10例、健康者42例につき血中抗体価を測定した結果は次表の通りであった。

表. 人血清中の結核菌リン脂質 PLA抗体価の測定

No.	疾患名	リン脂質PLA価
1	活動性肺結核	320
2	"	1280
3	"	640
4	"	2560
5	"	5120
6	"	640
7	"	1280
8	"	640
9	"	640
10	"	2560
	ツベルクリン陽性健康者28人	80以下
	ツベルクリン陰性健康者14人	80以下

以上の結果から明らかな如く、健康者はツベルクリン陽性、陰性を問わず、PLA反応は常に陰性を示したのに対し、活動性肺結核患者ではいずれも陽性で、320～5120と高値を示した。

このPLA反応を用いれば0.025ml 以下の試料で、何等の前処理もせずに、極めて容易に高い精度で結核菌リン脂質抗体を定量することができ、本発明は結核の診断、治療結果の判定に特に適しているといえる。